第 41 卷 增刊
1998 年 9 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol. 41, Suppl.
Sept., 1998

红胫戟纹蝗痘病毒形态及理化性质研究*

王丽英 杨红珍
（中国农业大学昆虫学系，北京 100094）
余晓光 阿不都·外力 巴哈提亚尔
（新疆蝗虫鼠害测报防治站，乌鲁木齐 830001）

摘要 红胫戟纹蝗 *Dociostaurus kraussi* 是新疆草原优势种蝗虫。1989 年首次从新疆玛纳斯红胫戟纹蝗上分离到痘病毒 *Dociostaurus kraussi* entomopoxvirus (DkEPV)，1992 年又在新疆巴里坤发现，自然流行率达 23.3%。显微镜观察表明该病毒主要感染脂肪体。病毒球状体为圆球状，直径为 2～7 μm，大小差异悬殊，病毒粒子砖形或椭圆形，表面呈桑椹结构，大小平均为 144 nm×269 nm。病毒 DNA 具有典型的核酸紫外吸收光谱。根据热变性曲线测得 DkEPV-DNA 的 T_m 值为 79.0, (G+C)% 为 23.7%。病毒 DNA 经限制性内切酶 *Eco*RI、*Bgl* II 和 *Hin*d III 酶切后，分别得到 29、21 和 18 个片段。以 λDNA *Hin*dIII 酶切片段为标准分子量，计算出各酶切片段的分子量为 155.45×10^6、155.69×10^6 和 155.40×10^6D，由此得出 DkEPV-DNA 总分子量为 155.5×10^6D。

关键词 红胫戟纹蝗痘病毒，DNA，限制性内切酶谱

昆虫痘病毒 (entomopoxvirus) 是一类具有大型包涵体的病毒。病毒粒子表面呈桑椹结构而区别于其它昆虫包涵体病毒。由于病毒形态结构与脊椎动物痘病毒颇相似而被列入痘病毒科 (Poxviridae) 中。近年研究表明，昆虫痘病毒与脊椎动物痘病毒没有血清学关系，昆虫痘病毒也不能在脊椎动物体内或组织培养细胞内繁殖，用分子生物学技术测定两类痘病毒基因组间没有同源性[1,2]。一些动物试验表明，昆虫痘病毒作为杀虫剂使用是安全的[3]。除杆状病毒外，这是另一类有可能发展为生物杀虫剂的昆虫病毒。至今已从五个昆虫目中分离到痘病毒，进行较详细研究的有 40 种以上[4]。

蝗虫痘病毒自 1966 年发现以来已报道了 15 种[5,6]，我国报道了 6 种[7]。通常认为痘病毒寄主范围窄，只限于一个种或少数种类。然而，一些研究表明，有些蝗虫痘病毒种类不仅可以感染同属蝗虫，也能感染同科蝗虫[8]。血黑蝗痘病毒 (MsEPV) 甚至能够感染等翅目的白蚁 *Reticulotermes flavipes*[9]。因此分离鉴定不同种蝗虫痘病毒，比较它们的生物学和生化特性，筛选病毒株，在理论和应用上均具有重要意义。

红胫戟纹蝗 *Dociostaurus kraussi* 是新疆草原优势种蝗虫。每年 4～6 月份发生，严重时除取食牧草外还为害小麦及禾谷类作物，1989 年首次从新疆玛纳斯红胫戟纹蝗上分离，1992 年在新疆巴里坤再次发现。本文采用电子显微镜和生物化学方法对该病毒

* 国家自然科学基金项目
1997-06-27 收稿，1998-03-29 收修改稿

的病症病理，形态结构和 DNA 特性等进行初步研究，结果报道如下：

1　材料和方法

1.1　病毒

新疆玛纳斯采集的罹病的红胫戟纹蝗病死虫尸加无菌水研磨过滤，经反复差速离心得到粗提纯病毒球状体，冰箱保存。

1.2　感染试验

野外采集 2～3 龄红胫戟纹蝗，室内饲养至 3～4 龄进行接种。将粗提病毒球状体稀释到 1×10^9OBS/L，涂于饲料上（麦苗或蒿草），单头喂饲。取吃光毒叶的若虫做试虫，置于养虫笼内正常饲养观察病症病理。收集病死虫尸，置 -20℃冰箱冷冻保存备用。

1.3　显微镜观察

取接种发病的红胫戟纹蝗解剖，取出消化道，马氏管，气管组织，表皮和脂肪体组织，用生理盐水洗净，涂片显微镜观察。取脂肪体 1 mm^3 小块，分别放入 2.5%戊二醛和 1%锇酸中双固定，丙酮系列脱水，Epon 812 包埋，醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色，透射电镜观察。取提纯的痘病毒球状体稀释成适宜浓度，涂于盖片上凉干、喷金、扫描电镜观察。

1.4　DkEPV 球状体和病毒粒子的纯化

取病死虫尸研磨过滤，反复差速离心，得到粗提的病毒球状体。粗提病毒球状体经蔗糖密度梯度（50%～65%，W/W）离心，22 000 r/min，4℃，离心 1 h，收集 58%和 60%界面处的深褐色带，洗去蔗糖即为纯化球状体。纯化球状体加碱性裂解液（0.3mol/L Na_2CO_3，0.5 mol/L NaCl，30 mmol/L EDTA，0.1 mol/L β-巯基乙醇，pH11.2）混匀，置 30℃水浴碱解 20～30 min，释放出病毒粒子，冰浴终止碱解。将含病毒粒子的裂解液置于蔗糖密度梯度（40%～55%，W/W），22 000 r/min，4℃离心 1h，取 45%和 50%之间的白色带，洗去蔗糖即为纯化的病毒粒子，溶于 TE 缓冲液中，4℃保存备用。

1.5　DkEPV-DNA 的提取纯化及限制性内切酶分析

取纯化病毒粒子加 2×SDS 裂解缓冲液（0.01 mol/L Tris-HCl，0.2 mol/L NaCl，1 mmol/L EDTA，1% SDS)，蛋白酶 K 和 β-巯基乙醇，置 50℃水浴 30 min，然后冷却至室温。加入等体积水饱和酚，轻轻颠倒数次，混匀，12 000 r/min，离心 4 min 分层，取上层水相用饱和酚重复抽提 2 次，氯仿:酚（1:1）抽提 1 次，氯仿 1 次，最后用乙醚除去酚。在水相中加入 1/10 体积的 0.25 mol/L NaCl 和 2 倍体积的无水乙醇，-20℃过夜，（或置液氮中 15 min)，12 000 r/min，10 min 离心沉淀 DNA，沉淀加入 70%冷乙醇漂洗，12 000 r/min 离心 10 min，置真空干燥器中，除去水份，再溶解于 TE 缓冲液中，-20℃冰箱保存备用。

在DkEPV-DNA酶反应缓冲液中，分别用限制性内切酶*Eco*R I，*Bgl* II和*Hin*d III酶解，37℃水浴2～3 h。

1.6 琼脂糖凝胶电泳

采用平板式琼脂糖凝胶电泳，凝胶浓度为0.5%，电压30 V，室温下电泳18 h。TBE电泳缓冲液，溴化乙锭直接加入凝胶中，紫外透射仪观察并拍照。

1.7 DkEPV-DNA紫外吸收光谱和热变性曲线的测定

将DkEPV核酸溶解于1×SSC中，并对大体积1×SSC透析过夜。在Beckman DU-8B紫外分光光度计上测定25℃时紫外吸收曲线（A200～300）。然后开始升温，从50℃起每隔1度升温1次，每个温度维持1 min。根据热变性曲线和Mandle等[10]的公式计算G+C的百分含量。

2 结果和讨论

2.1 DkEPV的病症和病理

红胫戟纹蝗若虫取食涂有病毒的饲料后，食物消耗逐渐减少，生长发育缓慢，到感病后期虫体腹部变白，体节拉长，死亡率渐渐增高，30 d左右几乎全部死亡。如病毒接种剂量大，2～3 d蝗虫即可死亡。解剖病虫各组织器官，显微镜下观察，该病毒仅感染脂肪体组织。病虫脂肪体的网状结构被破坏，脂肪体颜色也逐渐变浅呈乳白色。取小块脂肪体压片，显微镜下观察可看到许多圆形，近方形的颗粒即为病毒球状体。这种痘病毒在草原蝗虫上通常很难发现，1988年在新疆玛纳斯采集的113头蝗虫上仅发现1头，但在1992年在新疆巴里坤采集的374头红胫戟纹蝗上竟有87头感染痘病毒。可见这种痘病毒在不同年份，不同地区发生流行情况不同，有待进一步调查。

2.2 DkEPV球状体和病毒粒子的形态结构

球状体：在光学显微镜下观察平面图象，红胫戟纹蝗痘病毒与亚洲小车蝗痘病毒*Oedaleus asiaticus* entomopoxvirus（OaEPV）球状体不同，前者个体较小，多数为近方圆形，少数为球形，后者个体较大，多数为长椭圆形。红胫戟纹蝗痘病毒球状体也有的聚集在一起，但象亚洲小车蝗痘病病毒球状体那样呈"嵌合体"尚未观察到。在扫描电镜下观察立体图象，DkEPV球状体则为圆球状，大小分三类：较大的直径为6.2 μm，中等的直径为3.8 μm，较小的直径为2.4 μm。图象中还观察到不少表面有许多蜂窝状小孔的包涵体，从严重感病的病虫脂肪体中挑取包涵体制片，包涵体未经提纯，喷金后，扫描电镜观察表面带蜂窝状小孔的包涵体也很多，这很可能是未成熟的包涵体，看来病毒球状体成熟过程拉的较长（图1）。当球状体碱解释放病毒粒子时，未成熟球状体很快裂解，而成熟球状体则需较长时间，由于痘病毒包涵体个体大，光镜下很容易观察。

病毒粒子：病虫脂肪体组织制成超薄切片，在透射电镜下观察球状体内包埋的病毒粒子。从纵切面上（图2）可见到这种病毒粒子的形状近砖形和椭圆形，大小为144 nm×269 nm，在核心内有折叠成2～3折的电子非致密的绳索状结构；其横切面呈现出2

~4个电子非致密的圆点。不同种类的蝗虫痘病毒这些特性也有差异，如 OaEPV 的髓核折叠成2折其横切面有2个电子非致密的圆点。病毒粒子横切面最外层的囊膜呈波浪形，表面观察即为凹凸不平的桑椹结构。

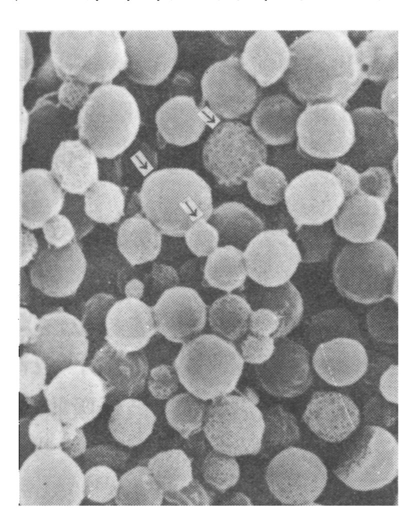


图1　DkEPV 在扫描电镜下的球状体形态结构
球状体大小差异悬殊

Fig. 1　Morphological characteristics of pheroids of DkEPV
Spheroids, very different in size

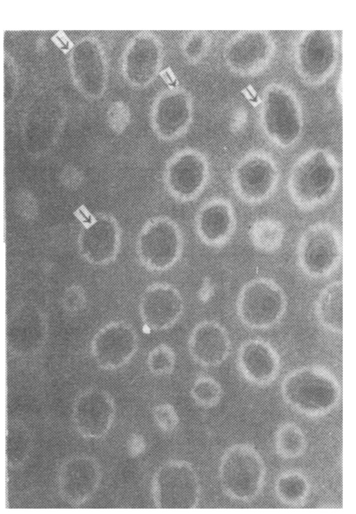


图2　DkEPV 感染的病虫脂肪体的超薄切片
示病毒粒子的纵切面，髓核为电子非致密的绳索结构折叠成2～3折；其横切面呈现出2～4个电子非致密的圆点

Fig. 2　Ultrathin section of fat bodies infected with DkEPV virions
Vertical section showing rope-like substances folded 2～3 times, cross section showing the circular core with 2～4 dots in the center

2.3　DkEPV 理化特性

2.3.1　病毒粒子紫外吸收特性：提纯病毒粒子悬浮液经紫外分光光度计检测，在240～300 nm 无明显的吸收峰，紫外吸收曲线呈平滑下降（图3），$OD_{260}/OD_{280}=1.15$。这

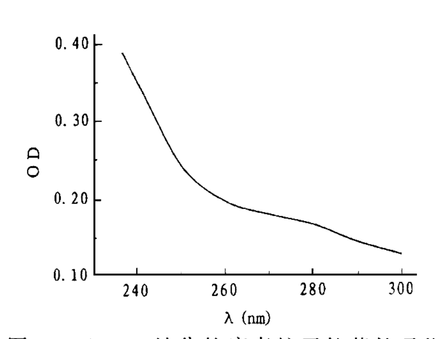


图3　DkEPV 纯化的病毒粒子的紫外吸收特征
在240～300 nm 无明显的吸收峰而呈平滑下降

Fig. 3　Ultraviolet absorption spectrum of DkEPV virions
No apparents absorption peak in 240～300 nm

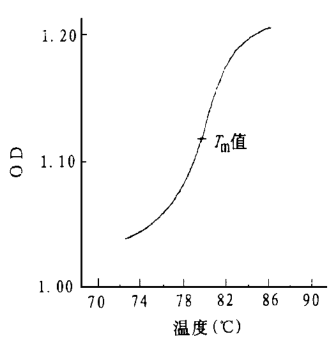


图4　DkEPV-DNA 在1×SSC 中的热变性曲线
从热变性曲线上测得 T_m 值为79.0℃

Fig. 4　Thermal denaturation curve of DkEPV-DNA in 1×SSC
T_m: 79. 0℃

表1 DkEPV-DNA三种限制性内切酶谱计算出各酶切片段分子量 (1×10⁶D)

Table 1 Molecular weight of DkEPV-DNA fragments produced by cleavage with *Bgl* II *Eco*R I and *Hin*d III (1×10⁶ daltons)

带 band	*Bgl* II	*Eco*R I	*Hin*d III
1	19.5	15.8	19.5
2	17.3	15.14	17.78(2)
3	11.22(2)	14.13	15.14
4	10.23	12.59(2)	12.59
5	8.51(3)	10.23(2)	10.23(2)
6	7.76	9.33	7.59
7	6.76	8.13	6.92
8	5.13	7.76(2)	6.31
9	4.79(2)	6.16	5.62
10	4.37(2)	5.62	5.13
11	3.89(2)	4.57(2)	4.90
12	3.72	3.63	3.89(2)
13	3.09	1.70(2)	3.72
14	1.91(2)	1.58	2.09(2)
15	1.74(2)	1.45	
16	1.48	1.02	
17	1.41(2)		
18	1.29		
19	0.9		
20	0.8		
合计	155.45	155.69	155.40

与王小凤报道的昆虫杆状病毒的紫外吸收曲线一致[11]。据分析，动物、植物和昆虫杆状病毒等这类带有荚膜结构的较大型病毒粒子，可能由于自身的光散射，缺乏典型的核蛋白吸收峰。昆虫痘病毒大小、结构与之相似，因此也有类似情况。

2.3.2 病毒DNA紫外吸收曲线和热变性曲线：DkEPV-DNA紫外分光光度计测定，25℃时，$OD_{260}/OD_{280} = 1.72$，最高吸收峰在260 nm，最低吸收峰在240 nm，具有典型的核酸紫外吸收光谱。

将DkEPV-DNA溶解在1×SSC中，测得热变性曲线（图4）。由图中得出的 T_m 值为79.0℃。根据Mandle等的公式求得DkEPV DNA的G+C含量为23.7%。

2.3.3 病毒DNA分子量：DkEPV DNA经限制性内切酶 *Bgl* II，*Eco*R I 和 *Hin*d III 酶切，分别得到29个片段，21个片段和18个片段（图5），以λDNA *Hin*d III酶切片段为标准分子量，计算出各酶切片段的分子量分别为 155.45×10^6、155.69×10^6 和 155.40×10^6。DkEPV DNA的总分子量为 155.50×10^6（表1）。

综上所述，新疆红胫戟纹蝗痘病毒的形态结构、DNA基因组性状和寄主等特性，这是一种新的痘病毒，命名为 *Dociostaurus kraussi* entomopoxvirus，简称DkEPV。

新疆红胫戟纹蝗痘病毒与内蒙古亚洲小车蝗痘病毒寄主不同，球状体形状、大小也不同，两种痘病毒DNA酶切图谱及分子量也有很大差异，但OaEPV克隆的一个片段能与DkEPV的DNA杂交[12]，说明它们之间有一定的同源性，同源性大小如何，尚待进一步研究。

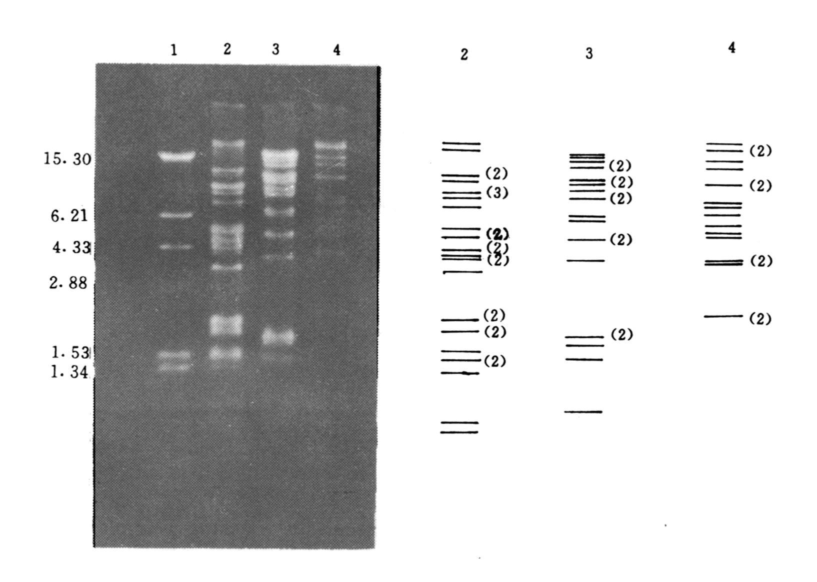


图 5　DkEPV-DNA 的限制性内切酶谱

1. λDNA 的 *Hin*d III 酶切片段；2. *Bgl* II 的酶切片段；3. *Eco*R I 的酶切片段；4. *Hin*d III 的酶切片段

Fig. 5　Cleavage of DkEPV-DNA with restriction endonucleases

1. λDNA *Hin*d III fragments; 2. *Bgl* II fragments; 3. *Eco*R I fragments; 4. *Hin*d III fragments

参　考　文　献

1 吕鸿声．昆虫病毒与昆虫病毒病．北京：科学出版社．1982．8

2 Langridge W H R. Detection of DNA base sequence homology between entomopoxvirus isolated from Lepidoptera and Orthoptera. J. Invertebr. Pathol., 1984, 43: 41～46

3 Bucker C H *et al*. The effect of poxvirus of the spruce budworm, *Choristoneura furmiferana* (Lepidoptera: Tortricidae), on mammals and birds. Can. Entomol., 1972, 104: 1 333～1 342

4 Goodwin R R *et al*. Entomopoxvirinae. In: Adans J R (eds.) Atlas of Invertebrate Viruses, CRC Press. Inc., 1991, 260～282

5 Henry J E *et al*. Pathology and development of the grasshopper inclusion body virus in *Melanoplus sanguinipes*. J. Virol., 1969, 3: 605～610

6 Oma E A *et al*. Host relationships of entomopoxviruses isolated from grasshoppers. Grasshopper Symp. Proc, Bismark, N. D, 1986, 48～49

7 王丽英等．经黄胫小车蝗增殖的亚洲小车蝗痘病毒 DNA 和结构蛋白特性．病毒学报，1995，11（4）：351～356

8 Streett D A *et al*. Pathogenic diseases of grasshoppers. In: Chapman R F (eds.) Biology of Grasshoppers. 1990, 484～511

9 Levin D B *et al*. Host specificity and molecular characterization of the entomopoxvirus of the lesser migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. J. Invertebr. Pathol., 1993, 43: 41～46

10 Mandle M *et al*. Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. In: Grossman L (eds). Methods in Enzymology, Vol 12, part B. New York and London: Acadmic Press,

1968, 195～206

11 王小凤等. 黄地老虎颗粒体病毒的研究. 微生物学报, 1983, 23 (1): 13～19

12 Wang L Y *et al*. Construction and primal application of a cloned DNA probe for *Oedaleus asiaticus* entomopoxvirus. Entomologia Sinica, 1995, 3 (3): 256～262

SOME CHARACTERISTICS OF *DOCIOSTAURUS KRAUSSI* ENTOMOPOXVIRUS IN XINJIANG UYGUR AUTONOMOUS REGION

Wang Liying Yang Hongzhen

(Entomology Department of China Agricultural University, Beijing 100094)

Yu Xiaoguang Arbudo·Waili Bahetiyaer

(Xinjiang Command Post of Grasshopper and Rodents Control, Ürümqi 830001)

Abstract *Dociostaurus kraussi* is the dominant species in Xinjiang rangeland. In 1989, *Dociostauras kraussi* entomopoxvirus (DkEPV) was first isolated from *Dociostaurus kraussi* in Manas, Xinjiang Automonous Region. In 1992, it was found in Barkol, Xinjiang, too. The natural epidemic rate of it was 23.3%. DkEPV was found to infect mainly the fat body. Occlusion bodies are spheroidal with diameter of 2～7 μm, very different in size. The virions obtained from the occlusion body are brick-shaped or ovoid, 144～269 nm in size. The surface of a virion has a mulberry-like structure. DkEPV showed the typical ultraviolet absorption spectrum of nucleic acid. The *T*m of DkEPV-DNA is about 79.0℃ based on the thermal denaturation curve, and its G + C content is about 17.8%. Restriction endonuclease analysis reveals that *Eco*R I, *Bgl* II and *Hin*d III digested the DkEPV-DNA into 29, 21 and 18 DNA fragments, respectively. Taking λDNA *Hin*d III fragments as standard for molecular weight measurement, the molecular weights of these DNA fragments are 155. 45 $\times 10^6$、155.69 $\times 10^6$ and 155.40 $\times 10^6$ daltons, repectively, and the total molecular weight is 155.5 $\times 10^6$ daltons.

Key words *Dociostaurus kraussi* entomopoxvirus, DNA, restriction endonuclease analysis